

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

インプリンティング異常を主徴とする先天異常症候群：第14番染色体父親性ダイソミーおよび
その類縁疾患、シルバーラッセル症候群

研究分担者 緒方勤 浜松医科大学小児科 教授

研究要旨

本研究班の目的は、先天異常症候群領域の指定難病等のQOL向上を目指すもので、我々はヒトインプリンティング疾患について検討を進めている。本年度の成果には、極めて稀なIGF2変異症例における変異パターンと臨床像の特徴を、H19/IGF2:IG-DMRエピ変異症例の比較から明確としたこと、同様に極めて稀な第20染色体母性ダイソミー5例における内分泌学的特徴を明らかとしたことが挙げられる。これらの成果は、シルバーラッセル症候群の遺伝的異質性や、原因毎の特徴的症状を理解するうえで重要な知見を与えるものである。

研究協力者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名：鏡雅代・国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部 室長

A. 研究目的

本研究班の目的は、先天異常症候群領域の指定難病等のQOL向上を目指すもので、我々はヒトインプリンティング疾患について検討を進めている。本年度においては、極めて稀なIGF2変異症例における変異パターンと臨床像の特徴を、H19/IGF2:IG-DMRエピ変異症例の比較から明確にし、また、極めて稀な第20染色体母性ダイソミー5例における内分泌学的特徴を明らかにした。

B. 研究方法

Silver-Russell 症候群 (SRS)あるいは子宮内発育不全 (IUGR)表現を有する患者において、インプリンティング疾患発症関連 DMR のメチル化解析や全エクソーム解析を含む網羅的な分子遺伝学的解析、ならびに詳細なデータシートを用いた包括的臨床解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針を遵守して行い、検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集した。なお、下記の研究課題が、浜松医科大学倫理委員会で承認されていることを付記する。

- 成長障害における遺伝的原因の探索
- 先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索

- 胎児・胎盤の成長・発達における遺伝および環境因子の検討

C. 研究結果

1. 父由来染色体上に存在するIGF2変異陽性患者の5例の同定とIGF2/H19:IG-DMRエピ変異症例との臨床像比較

近年、父由来アレル上の IGF2 変異例が同定され、SRS の表現型を呈することが報告されているが、その臨床像の詳細は明らかではない。我々は、メチル化解析で異常が認められなかった SRS/IUGR 症例に対する全エクソーム解析ならびにメチル化感受性制限酵素を用いたシーケンサーで5例の父由来アレル上に存在する IGF2 変異症例を同定した (図 1)。1例は体細胞モザイクで、残る4例は生殖細胞由来の無機能と推測される変異 (エクソン2のスキップや S-S 結合の破壊) を有していた。4例の非モザイク患者は、全例成長障害と SRS 表現型を呈していた (図 2)。さらに、1例では裂手裂足症が、1例では性分化疾患が認められた。

次に、我々は今回同定された非モザイク患者4例および文献に報告された非モザイク患者4例と文献に報告された非モザイク患者10例型14例の臨床症状をまとめ、それを H19/IGF2:IG-

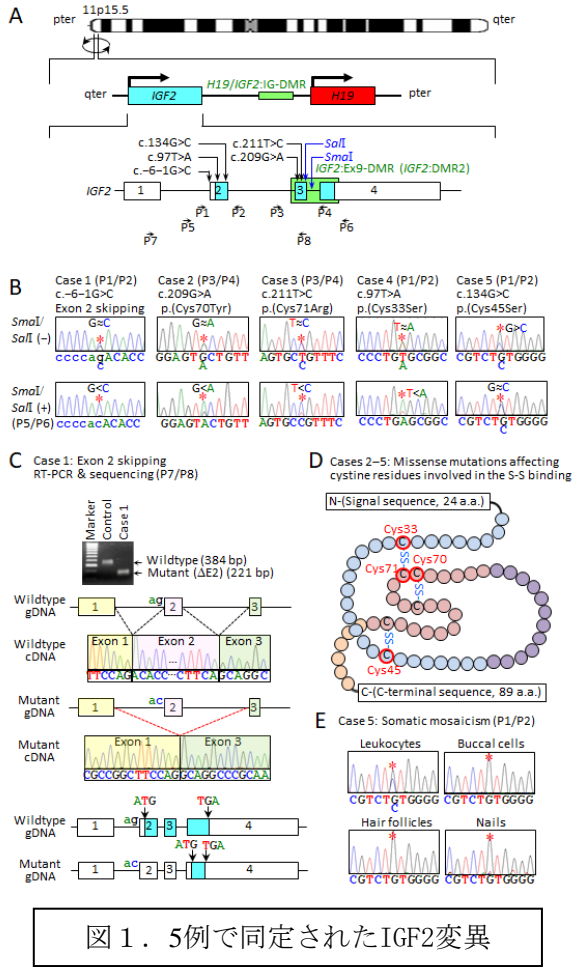


図1. 5例で同定されたIGF2変異

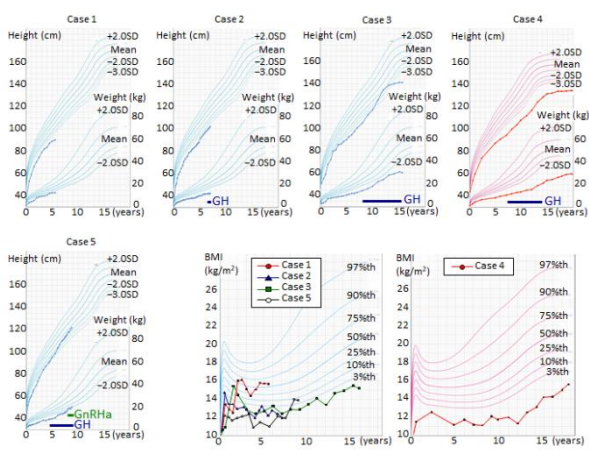


図2. 非モザイク4例の成長パターン

DMR エピ変異症例の臨床所見を比較した (表 1)。その結果、IGF2 変異群は、H19/IGF2:IG-DMR エピ変異群に比し、全例 SRS 診断クライテリアを満足すること、摂食障害が強いこと、半身低形成を欠くこと、相対的頭圍拡大の程度が低いこと、血清 IGF-II が低いこと、四肢形成不全、性分化疾患、心血管奇形が多いことが判明した。そして、これらの表現型の差異は、(1) インプリンティングを受ける組織 (ほぼ全身) の IGF2 発現が、IGF2 変異群では消失し、一方、

表 1. IGF2変異群とH19/IGF2:IG-DMRエピ変異群の表現型比較

	IGF2 mutations non-mosaic ^a	H19/IGF2:IG-DMR epimutations ^b	P-value
<Netchine-Haribson scoring system features for Silver-Russell syndrome>			
Diagnosis of SRS (≥ 4/6)	14/14 (100%)	43/43 (100%)*	1.00
Scoring system criteria (6/6)	3/14 (21.4%)	10/43 (23.2%)*	1.00
Scoring system criteria (5/6)	11/14 (78.6%)	16/43 (37.2%)*	0.012
Scoring system criteria (4/6)	0/14 (0%)	17/43 (39.5%)*	0.0053
Birth length and/or weight ≤ -2 SDS	14/14 (100%)	35/35 (100%)†	1.00
Postnatal height ≤ -2 SDS (~2 years)	14/14 (100%)	145/173 (83.8%)†	0.13
Relative macrocephaly at birth	14/14 (100%)	111/112 (99.1%)†	1.00
Prominent forehead (1-3 years)	14/14 (100%)	118/126 (93.7%)†	1.00
Body asymmetry (hemihypoplasia)	3/14 (21.4%)	175/226 (77.4%)†	<0.001
Feeding difficulties and/or low BMI	14/14 (100%)	124/173 (71.7%)†	0.023
<Pregnancy and delivery>			
Gestational age (weeks)	36 (29 ~ 43) (n=14)	38 (34 ~ 40) (n=36)*	
Placental weight - SDS	-2.7 ± 0.5 (n=4)	-2.1 ± 0.7 (n=14)*	0.13
Hypoplastic placenta (<80%)	4/4 (100%)	11/12 (91.6%)‡	1.00
Oligohydramnios	3/6 (50.0%)	7/11 (63.6%)‡	0.64
<Growth>			
Birth length - SDS	-4.2 ± 0.9 (n=14)	-4.1 ± 2.0 (n=31)*	0.86
Birth weight - SDS	-3.9 ± 0.8 (n=14)	-3.5 ± 0.9 (n=42)*	0.15
Birth OFC - SDS	-1.6 ± 0.7 (n=14)	-0.5 ± 1.2 (n=29)*	0.0029
Postnatal height - SDS	-4.6 ± 0.9 (n=12)	-3.6 ± 1.7 (n=35)*	0.059
Postnatal weight - SDS	-3.8 ± 1.4 (n=11)	-3.2 ± 1.2 (n=32)*	0.18
Postnatal OFC - SDS	-2.6 ± 1.4 (n=11)	-1.2 ± 1.2 (n=21)*	0.059
<Craniofacial features not included in Netchine-Haribson criteria>			
Triangular face	14/14 (100%)	73/74 (98.6%)†	1.00
Low set ears or ear anomalies	7/11 (63.6%)	70/140 (50.0%)†	0.53
Cleft palate	6/14 (42.8%)
Micrognathia	8/8 (100%)	59/79 (74.7%)†	0.19
<Limb/digital features>			
Long bone deficiency	1/14 (7.1%)	... (0%)†	...
Ectrodactyly	3/14 (21.4%)	... (0%)†	...
Polydactyly	1/14 (7.1%)	... (0%)†	...
Syndactyly	5/14 (35.7%)	59/141 (41.8%)†	0.78
Clinodactyly	12/14 (85.7%)	142/176 (80.7%)†	1.00
<Genital features in male patients>			
Hypospadias	4/10 (40.0%)
Abnormal scrotum	3/9 (33.3%)
Cryptorchidism	2/8 (25.0%)
Microphallus	1/6 (16.7%)
Any genital feature	6/10 (60.0%)	28/63 (44.4%)†	0.50
<Other features>			
Cardiovascular anomalies	7/14 (50.0%)	5/44 (11.4%)‡	0.0047
<Development>			
Motor delay	9/12 (75.0%)	43/141 (30.5%)†	0.0032
Speech delay	8/11 (72.7%)	32/101 (31.7%)†	0.016
<Endocrine findings>			
Serum GH - mg/L (peak value)	16.1 ± 7.0 (n=6)	21.9 ± 21.4 (n=17)‡	0.53
Serum IGF-I - SDS	+1.5 ± 2.5 (n=12)	-0.0 ± 1.1 (n=17)‡	0.033
Serum IGFBP-3 - SDS	+0.5 ± 2.2 (n=9)	+1.4 ± 1.0 (n=17)‡	0.17
Serum IGF-II - SDS	-1.6 ± 0.8 (n=10)	+0.2 ± 1.4 (n=17)‡	0.010

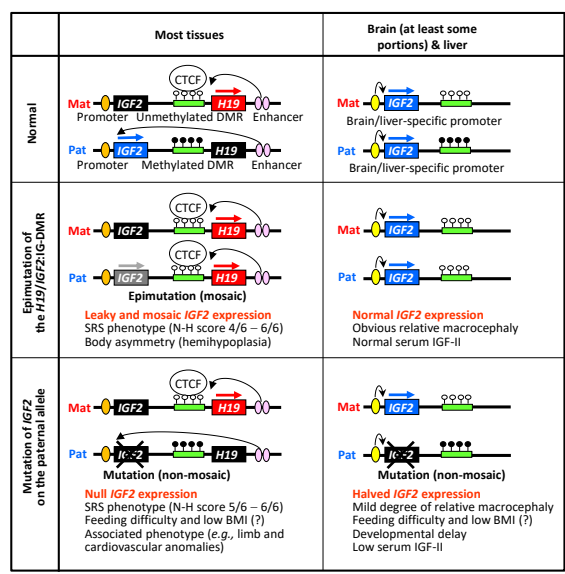


図3. IGF2変異群とH19/IGF2-DMRエピ変異群におけるIGF2発現パターン

H19/IGF2:IG-DMR エピ変異群では leaky に存在すること (したがって、IGF2 変異群が、より典型的な SRS を招く)、(2) IGF2 変異が全身に存在

することに対し、H19/IGF2:IG-DMR エピ変異はモザイク状態で存在すること（したがって、半身低形成が出現する）、(3) インプリンティングを受けない組織（脳の一部や肝臓）のIGF2発現が、IGF2 変異群では半減し、一方、H19/IGF2-DMR エピ変異群では正常であることで説明される（図3）。

2. 第20染色体母性ダイソミー (UPD (20)mat) の内分泌学的特徴

UPD (20)matは、極めて稀な病態であり、現在までにSRS/IUGRをしばしば招くことが知られている。そして、様々な内分泌関連G-protein coupling receptorのシグナル伝達を介在し、腎近位尿管、下垂体、甲状腺、性腺でインプリンティングされ母性発現を示すGNAS-Gsαが第20染色体に存在することからUPD (20)matに伴う内分泌的異常が想定されている。我々は、151例の原因不明のSRS/IUGRを呈する患者の解析で、5例のUPD (20)mat症例を同定した。

次に表現型解析で、全例が成長障害を呈すること（図4）、さらに3例がSRSの診断クライテリアを満足することが判明した。さらに、詳細な内分泌学的検査を行い、母由来GNAS-Gsαに一致する血清Ca高値を2例で、iPTH低値を1例で、甲状腺機能亢進を1例で見出した（表2）。これは、世界で初めてGNAS-Gsα過剰が内分泌的異常所見を呈することを見出したものである。

D. 考察

我々は、今年度、IGF2 変異という稀な Silver-Russell 症候群原因の同定、ならびに UPD (20)mat というまれな病態における表現型（特に内分泌表現型）を明らかとした。このような成果は、インプリンティング疾患の発症機序の解明や遺伝学的診断法の確立、ならびに原因ごとの合併症や長期予後の把握に有用であると期待される。

E. 結論

種々のインプリンティング疾患において、新しい発症機序を同定し、詳細な表現型を明らかにした。

Hormonal findings of our patients.						
Patient	Patient 1		Patient 2		Patient 3	
Sex	Female	Male	Female	Female	Male	Male
Age at examination (yr/month)	15/1	10/9	7/10	2/2	2/4	2/4
Calcium (mmol/L)	2.37 (2.17-2.55)	2.40 (2.17-2.55)	2.47 (2.17-2.55)	2.71 (2.20-2.65)	2.69 (2.20-2.65)	2.69 (2.20-2.65)
Inorganic phosphate (mmol/L)	1.23 (0.90-1.86)	1.84 (1.22-1.99)	1.58 (1.22-1.99)	1.48 (1.22-1.99)	1.55 (1.22-1.99)	1.55 (1.22-1.99)
Alkaline phosphatase (IU/L)	954 (300-975)	950 (300-975)	631 (300-975)	795 (300-975)	661 (300-975)	661 (300-975)
Intact PTH (pmol/L)	3.7 (1.5-8.3)	4.3 (1.5-8.3)	1.8 (1.5-8.3)	1.1 (1.5-8.3)	1.7 (1.5-8.3)	1.7 (1.5-8.3)
1,25 (OH) ₂ vitamin D (pmol/L)	157 (48-167)	145 (48-167)	62 (48-167)	156 (48-167)	79 (48-167)	79 (48-167)
TSH (mIU/L)	<0.02 (0.4-4.0)	1.02 (0.4-4.0)	1.25 (0.4-4.0)	2.37 (0.4-4.0)	2.27 (0.4-4.0)	2.27 (0.4-4.0)
Free T ₄ (pmol/L)	5.8 (3.5-6.7)	7.4 (3.9-7.4)	6.2 (3.8-7.0)	6.6 (3.5-6.7)	6.0 (3.5-6.7)	6.0 (3.5-6.7)
Free T ₃ (pmol/L)	17.5 (12.2-23.6)	14.7 (13.0-25.2)	17.1 (13.4-25.9)	14.2 (12.9-24.8)	14.3 (12.9-24.8)	14.3 (12.9-24.8)
LH (IU/L)	2.7 (0.4-6.5)	0.5 (64.3)	<0.1 (<0.3)	<0.2 (<0.3)	<0.1 (<0.3)	<0.1 (<0.3)
FSH (IU/L)	3.4 (0.3-7.8)	1.2 (0.4-3.9)	1.4 (0.4-5.5)	3 (0.4-5.5)	0.6 (<0.9)	0.6 (<0.9)
Estradiol (pmol/L)	51.4 (<936)	NE	<18.4 (<37)	NE	NE	NE
Testosterone (nmol/L)	NE	0.8(0.1-2.4)	NE	NE	0.1 (0.1-1.1)	0.1 (0.1-1.1)
GH (basal / peak) (µg/L)	0.73/70.4 ^a	NE	NE	NE	2.4/14.6 ^b	2.4/14.6 ^b
Age at examination (yr/month)	9/01	1/00	5/07	1/08	2/00	2/00
IGFBP3 µg/mL	NE	1.02 (1.02-2.05)	NE	NE	NE	NE
IGF-1 ng/mL	91 (133-517)	12 (14-148)	107 (89-357)	19 (32-186)	20 (18-154)	20 (18-154)

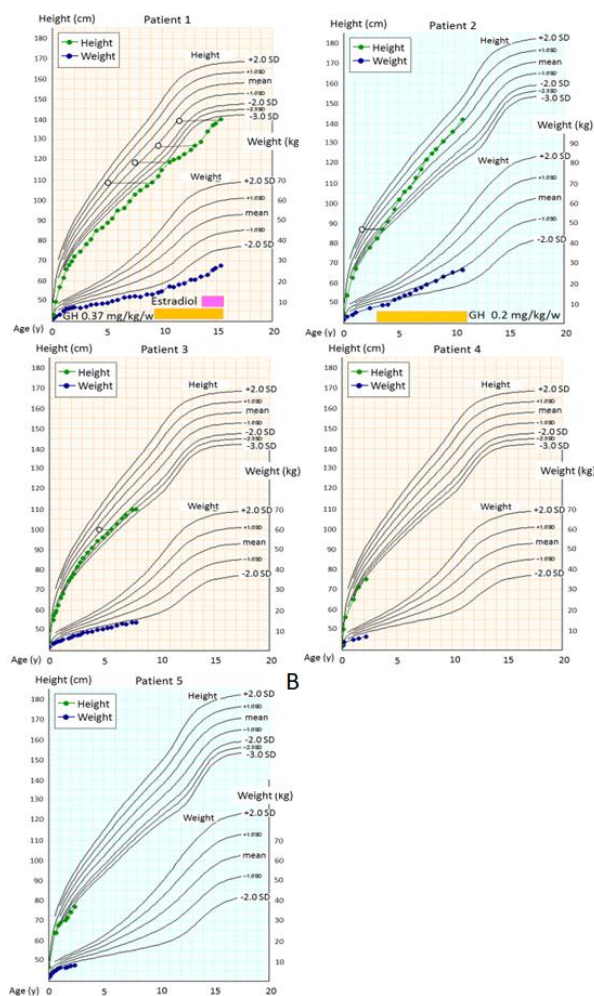


図4. UPD (20)mat患者の成長パターン

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suzuki E., Shima H., Kagami M., Soneda S., Tanaka T., Yatsuga S., Nishioka J., Oto Y., Kamiya T., Naiki Y., Ogata T., Fujisawa Y., Nakamura A., Kawashima S., Morikawa S., Horikawa R., Sano S. and Fukami M. (Epi)genetic defects of MKRN3 are rare in Asian patients with central precocious puberty. Hum Genome Var. 6. 7. 2019.
- 2) Nakashima M., Tohyama J., Nakagawa E., Watanabe Y., Siew C. G., Kwong C. S., Yamoto K., Hiraide T., Fukuda T., Kaname T., Nakabayashi K., Hata K., Ogata T., Saito H. and Matsumoto N. Identification of de novo CSNK2A1 and CSNK2B variants in cases of global developmental delay with seizures. J Hum Genet. 64. 313-322. 2019.
- 3) Hiraide T., Ogata T., Watanabe S., Nakashima M., Fukuda T. and Saito H. Coexistence of a CAV3 mutation and a DMD deletion in a family with complex muscular diseases. Brain Dev. 41. 474-479. 2019.

- 4) Hattori H., Hiura H., Kitamura A., Miyauchi N., Kobayashi N., Takahashi S., Okae H., Kyono K., Kagami M., Ogata T. and Arima T. Association of four imprinting disorders and ART. *Clin Epigenetics*. 11. 21. 2019.
- 5) Miyado M., Fukami M., Takada S., Terao M., Nakabayashi K., Hata K., Matsubara Y., Tanaka Y., Sasaki G., Nagasaki K., Shiina M., Ogata K., Masunaga Y., Saitsu H. and Ogata T. Germline-Derived Gain-of-Function Variants of Galpha-Coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *J Am Soc Nephrol*. 30. 877-889. 2019.
- 6) Matsubara K., Itoh M., Shimizu K., Saito S., Enomoto K., Nakabayashi K., Hata K., Kurosawa K., Ogata T., Fukami M. and Kagami M. Exploring the unique function of imprinting control centers in the PWS/AS-responsible region: finding from array-based methylation analysis in cases with variously sized microdeletions. *Clin Epigenetics*. 11. 36. 2019.
- 7) Kagami M., Yanagisawa A., Ota M., Matsuoka K., Nakamura A., Matsubara K., Nakabayashi K., Takada S., Fukami M. and Ogata T. Temple syndrome in a patient with variably methylated CpGs at the primary MEG3/DLK1:IG-DMR and severely hypomethylated CpGs at the secondary MEG3:TSS-DMR. *Clin Epigenetics*. 11. 42. 2019.
- 8) Matsushita R N. K., Ayabe T, Kinjo S, Haruna H, Ihara K, Hasegawa T, Ogata T., Ozono K, Minamitani K, Thyroid Committee of the Japanese Society for Pediatric Endocrinology. Early Calcitonin Level-Based Thyroidectomy May Reduce Postoperative Complications and Improve Prognosis in MEN2. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 32. accepted. 2020.
- 9) Hamanaka K., Takata A., Uchiyama Y., Miyatake S., Miyake N., Mitsuhashi S., Iwama K., Fujita A., Imagawa E., Alkanaq A. N., Koshimizu E., Azuma Y., Nakashima M., Mizuguchi T., Saitsu H., Wada Y., Minami S., Katoh-Fukui Y., Masunaga Y., Fukami M., Hasegawa T., Ogata T. and Matsumoto N. MYRF haploinsufficiency causes 46,XY and 46,XX disorders of sex development: bioinformatics consideration. *Hum Mol Genet*. 28. 2319-2329. 2019.
- 10) Uehara E., Hattori A., Shima H., Ishiguro A., Abe Y., Ogata T., Ogawa E. and Fukami M. Unbalanced Y;7 Translocation between Two Low-Similarity Sequences Leading to SRY-Positive 45,X Testicular Disorders of Sex Development. *Cytogenet Genome Res*. 158. 115-120. 2019.
- 11) Ushijima K., Narumi S., Ogata T., Yokota I., Sugihara S., Kaname T., Horikawa Y., Matsubara Y., Fukami M., Kawamura T., Japanese Study Group of Insulin Therapy for C. and Adolescent D. KLF11 variant in a family clinically diagnosed with early childhood-onset type 1B diabetes. *Pediatr Diabetes*. 20. 712-719. 2019.
- 12) Yoshida T., Miyado M., Mikami M., Suzuki E., Kinjo K., Matsubara K., Ogata T., Akutsu H., Kagami M. and Fukami M. Aneuploid rescue precedes X-chromosome inactivation and increases the incidence of its skewness by reducing the size of the embryonic progenitor cell pool. *Hum Reprod*. 34. 1762-1769. 2019.
- 13) Yamoto K., Saitsu H., Nishimura G., Kosaki R., Takayama S., Haga N., Tonoki H., Okumura A., Horii E., Okamoto N., Suzumura H., Ikegawa S., Kato F., Fujisawa Y., Nagata E., Takada S., Fukami M. and Ogata T. Comprehensive clinical and molecular studies in split-hand/foot malformation: identification of two plausible candidate genes (LRP6 and UBA2). *Eur J Hum Genet*. 27. 1845-1857. 2019.
- 14) Shimizu D., Sakamoto R., Yamoto K., Saitsu H., Fukami M., Nishimura G. and Ogata T. De novo AFF3 variant in a patient with mesomelic dysplasia with foot malformation. *J Hum Genet*. 64. 1041-1044. 2019.
- 15) Yamaguchi Y; Yoshihashi H; Fukami M; Saitsu H; Kagami M; Ogata. IGF2 Mutations: Report of Five Cases, Review of the Literature, and Comparison with H19/IGF2:IG-DMR Epimutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 105. 116-125. 2020.
- 16) Ohishi A., Masunaga Y., Iijima S., Yamoto K., Kato F., Fukami M., Saitsu H. and Ogata T. De novo ZBTB7A variant in a patient with macrocephaly, intellectual disability, and sleep apnea: implications for the phenotypic development in 19p13.3 microdeletions. *J Hum Genet*. 65. 181-186. 2020.
- 17) Fukuda T., Hiraide T., Yamoto K., Nakashima M., Kawai T., Yanagi K., Ogata T. and Saitsu H. Exome reports A de novo GNB2 variant associated with global developmental delay, intellectual disability, and dysmorphic features. *Eur J Med Genet*. 63. 103804. 2020.
- 18) Ushijima K., Okuno M., Ayabe T., Kikuchi N., Kawamura T., Urakami T., Yokota I., Amemiya S., Uchiyama T., Kikuchi T., Ogata T., Sugihara S., Fukami M., Japanese Study Group of Insulin Therapy for C. and Adolescent D. Low prevalence of maternal microchimerism in peripheral blood of Japanese children with type 1 diabetes. *Diabet Med*. 20. 712-719. 2019.
- 19) Imura K., Ikeya S., Ogata T. and Tokura Y. Erythrokeratoderma variabilis et progressiva with a rare GJB3 mutation. *J Dermatol*. 47. e111-

e113. 2020.

- 20) Hiraide T., Kubota K., Kono Y., Watanabe S., Matsubayashi T., Nakashima M., Kaname T., Fukao T., Shimozawa N., Ogata T. and Saito H. POLR3A variants in striatal involvement without diffuse hypomyelination. *Brain Dev.* 42. 363-368. 2020.
- 21) Kinjo K., Yoshida T., Kobori Y., Okada H., Suzuki E., Ogata T., Miyado M. and Fukami M. Random X chromosome inactivation in patients with Klinefelter syndrome. *Mol Cell Pediatr.* 7. 1. 2020.
- 22) Hiraide T., Watanabe S., Matsubayashi T., Yanagi K., Nakashima M., Ogata T. and Saito H. A de novo TOP2B variant associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. *Mol Genet Genomic Med.* 8. e1145. 2020.
- 23) Hayashi T., Hosono K., Kubo A., Kurata K., Katagiri S., Mizobuchi K., Kurai M., Mamiya N., Kondo M., Tachibana T., Saito H., Ogata T., Nakano T. and Hotta Y. Long-term observation of

a Japanese mucopolysaccharidosis IV patient with a novel homozygous p.F313del variant of MCOLN1. *Am J Med Genet A.* 2020.

2. 学会発表
省略

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
なし